

## Gebrauchsanleitung – MammaPrint FFPE-Microarray

### **Einleitung**

Der MammaPrint-Test ist ein Genexpressionsprofil zur Prognostizierung des klinischen Ergebnisses bei Brustkrebspatientinnen. Der Entwicklung des Tests lag die Erkenntnis zugrunde, dass der natürliche Verlauf eines Tumors von seinen Gensignalwegen bestimmt wird. So können Genexpressionsprofile zusätzlich zur klinischen Standardpathologie eine genauere Prognose liefern und das Ansprechen auf eine Behandlung genauer vorhersagen.

Mithilfe eines ergebnisoffenen Ansatzes wurde die MammaPrint-Gensignatur definiert. Dies erfolgte durch die genomweite Analyse von 25.000 Genen von Tumorproben bei unbehandeltem Primärbrusttumor und den Vergleich der Genaktivitätsprofile von Patientinnen, die innerhalb von fünf Jahren Fernmetastasen entwickelten, mit Profilen von Patientinnen, die im gleichen Zeitraum keine Fernmetastasierung aufwiesen. Daraus ging ein Genprofil mit 70 Genen hervor, das zwischen Patientinnen differenzieren kann, die in Bezug auf die Entwicklung von Metastasen ein hohes Risiko haben, und solchen, deren Langzeitrisiko der Fernmetastasierung so niedrig ist, dass sie von systemischer Therapie wenig bis gar keine absoluten klinischen Vorteile haben. <sup>(1,2)</sup>

*Rezidivrisiko* – Der MammaPrint-Test analysiert die Expression von 70 spezifischen Genen von Gewebeproben durch eine aus Brusttumorproben isolierte RNA-Analyse auf spezifischen Microarray-Glasträgern. Das Expressionsprofil findet danach Einsatz in einem proprietären Algorithmus zur kategorischen Klassifizierung, ob für eine Brustkrebspatientin ein hohes oder ein geringes Rezidivrisiko besteht.

### **Verwendungszweck**

MammaPrint® FFPE ist ein qualitativer, nicht automatisierter und im Diagnoselabor von Agendia durchgeführter In-vitro-Diagnosetest. Dabei wird ein Genexpressionsprofil verwendet, das aus Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Brustkrebsgewebeproben (FFPE) gewonnen wird und zur Bewertung des Risikos einer Patientin auf Bildung von Fernmetastasen innerhalb von fünf Jahren dient.

MammaPrint liefert prognostische Informationen über das Risiko der Entstehung von Fernmetastasen und eine Vorhersage über die Größe des Nutzens einer systemischen Therapie und kann bei der Behandlung von Brustkrebspatientinnen als Entscheidungshilfe dienen.

Die MammaPrint-Gene messen die Eigenschaften der mehrstufigen Entwicklung von Brustkrebszellen zum Überleben, Vermehren, Ausbreiten und Metastasieren, die zu den krebsspezifischen Merkmalen gerechnet werden. <sup>(3)</sup>

Der Test wird bei Brustkrebspatientinnen im Stadium I oder II, die lymphknotennegativ oder lymphknotenpositiv mit bis zu 3 positiven Knoten sind, mit einer Tumorgöße von 5,0 cm oder weniger, und bei Patientinnen im Stadium III durchgeführt. Die FFPE-Ergebnisse des MammaPrint®-Tests sind von Ärzten zu verwenden und in Kombination mit anderen klinisch-pathologischen Faktoren zu bewerten.

### **Zielgruppe**

MammaPrint FFPE-Microarray kann von Ärzten angefordert werden, die Brustkrebspatientinnen behandeln. Durch die Bestellung des MammaPrint FFPE-Microarray-Tests fordert der Arzt bei Agendia die Durchführung eines Tests anhand der bereitgestellten Probe im Diagnoselabor von Agendia an.

## **Testprinzip**

---

Die Analyse beruht auf mehreren, nicht automatisierten Prozessen: Isolierung der RNA aus FFPE-Brustkrebsgewebeschnitten; Herstellung von cDNA durch Reverse Transcription der RNA; Amplifikation und Markierung der cDNA; Hybridisierung der amplifizierten und markierten cDNA auf dem diagnostischen Microarray; Waschen und Scannen der diagnostischen Microarrays sowie Datenerhebung (Merkmalextraktion); Berechnung und Ermittlung des Rezidivrisikos (MammaPrint).

Die MammaPrint-Analyse ist dafür konzipiert, die Aktivität spezifischer Gene in einer Gewebeprobe zu ermitteln. Das Ergebnis ist ein Expressionsprofil, ein sogenannter „Fingerprint“ der Probe. Anhand dieses Expressionsprofils wird der MammaPrint-Index berechnet und das molekulare Profil der Probe ermittelt (niedriges bzw. hohes Risiko).

## **Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen**

---

Es muss eine korrekte Entsprechung der Patientenidentifikation auf dem Antragsformular und der Identifikation der Probe im LIMS-System vorliegen. Es wird eine interne Kennung erstellt, die der Probe im Laborverfahren korrekt zuzuweisen ist.

Auf der Testanfrage müssen die entsprechenden Informationen angegeben werden.

Die für den MammaPrint-Test ausgewählte Probe muss den Merkmalen der Zielpopulation entsprechen. Dazu zählen u. a. Brustkrebs bei Frauen, Frühstadium und eine Tumorzellularität von mindestens 30 %.

Die MammaPrint-Ergebnisse sind von Ärzten als molekulares Profil ergänzend zu klassischen klinisch-pathologischen Faktoren zu verwenden. Der Test ist nicht für die Krankheitsprognostizierung konzipiert.

Ergibt ein MammaPrint-Test ein niedriges Risiko, ist dies keine Garantie dafür, dass der Krebs innerhalb von fünf Jahren nicht erneut auftritt. Ergibt ein MammaPrint-Test ein hohes Risiko, ist dies keine Garantie dafür, dass der Krebs erneut auftritt. Die Testergebnisse sind in Kombination mit klinisch-pathologischen Faktoren zu verwenden.

## **Verfahren**

---

### **a) Auswahl der Patientinnen**

Der Test ist für weibliche Patienten geeignet, bei denen Brustkrebs im Stadium I, II oder III diagnostiziert wurde, die lymphknotennegativ bzw. lymphknotenpositiv (bis zu 3 positive Knoten) sind und eine Tumorgöße von  $\leq 5,0$  cm aufweisen, unabhängig vom Östrogenrezeptorstatus (ER+/-).

### **b) Probenahme, Registrierung und Versand**

Die Bedingungen für die Probenahme, Handhabung und Vorbereitung der Probe werden dem Kunden in der Gebrauchsanweisung vermittelt: MKT-067. Dieser Kit enthält Folgendes:

- 10 Mikroskop-Objektträger
- 2 Objektträgerhalter
- Kleiner und großer Druckverschlussbeutel aus Kunststoff

- Anweisung zur Probenahme
- Testanfrageformular
- Etikettenblatt mit Barcode-Etiketten
- Versandmaterial

Die Probenregistrierung wird durch eine Benachrichtigung des bestellenden Arztes initiiert. Diese Benachrichtigung (Testanfrageformular) kann online über das Kundenportal oder über andere Kommunikationskanäle erfolgen. Agendia registriert alle entsprechenden Proben- und Patientendaten. Das Testanfrageformular ist jeweils nur für eine Patientin zu verwenden. Die Probe wird vom bestellenden Arzt bei Umgebungstemperatur und mit den zur Verfügung gestellten Kurierttransportmaterialien direkt an Agendias Diagnoselabor versandt.

### ***c) Probenanalyse bei Agendia***

Es werden FFPE-Gewebeschnitte verwendet, die entweder vom Kunden auf Glasobjektträgern bereitgestellt oder mit einem gängigen Mikrotom aus FFPE-Tumorblöcken erstellt wurden. Die Gesamt-RNA wird mit einem handelsüblichen Isolierungs-Kit aus den Gewebeschnitten extrahiert. Die RNA-Probe wird aufgereinigt, amplifiziert und mit einem Cyanin-CTP/dUTP fluoreszierenden Farbstoff markiert.

Die RNA/cDNA-Probe wird auf einem speziell entworfenen diagnostischen Microarray hybridisiert (8er-Packung, Agilent Technologies). Ein Microarray-Scanner von Agilent wird zum Scannen des diagnostischen Microarrays verwendet. Das Ergebnis ist eine Scan-Datei (TIFF). Diese Datei wird von der Agilent Feature Extraction Software verwendet. Die Feature Extraction Software analysiert die Scan-Datei (TIFF), indem sie die relativen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Merkmale im Vergleich zur diagnostischen Microarray Chip-Design-Datei als Template ermittelt, um Kontrollmerkmale, Normalisierungsmerkmale und Reportergermerkmale zu identifizieren. Die Fluoreszenzintensität der Merkmale ist ein Maß für die Expression bestimmter Gene.

### ***d) Datenanalyse***

Die Datenanalyse wird nach dem MammaPrint-Algorithmus durchgeführt, der den MammaPrint-Index berechnet und das molekulare Profil der Probe ermittelt (niedriges Risiko, hohes Risiko). Proben mit einem MammaPrint-Index größer als 0 werden als niedriges Risiko eingestuft, während Proben mit einem Wert kleiner als oder gleich 0 als hohes Risiko eingestuft werden.

Der MammaPrint-Index einer Probe kann in einen vordefinierten Bereich um den Klassifizierungsschwellenwert zwischen  $> -0,05$  und  $< 0,05$  fallen, in dem das MammaPrint-Ergebnis eine Klassifizierungsgenauigkeit von  $< 90\%$ , aber nicht unter  $50\%$  aufweist (Borderline-Probe).

Es werden umfassende Qualitätskontrollen ( $> 25$ ) durchgeführt, um ein korrektes Analyseergebnis zu gewährleisten. Die Qualitätskontrollen werden vom Laborleiter intern begutachtet und genehmigt.

### ***e) Berichterstattung***

Der bestellende Arzt erhält einen Patientenbericht sowie eine Ergebniszusammenfassung für jeden bestellten MammaPrint FFPE-Microarray-Test. Wir verweisen in Bezug auf die personengebundenen Daten der Patientinnen auf unsere Datenverarbeitungsbedingungen in der Datenschutzrichtlinie von Agendia.

### ***Einschränkungen des Verfahrens***

---

MammaPrint wurde ausschließlich für die Verwendung mit weiblichem Brustkrebstumorgewebe validiert. Tests mit anderen Probentypen können zu fehlerhaften oder fehlenden Ergebnissen führen. Zuverlässige Ergebnisse sind von geeigneten Probenentnahmen und Transportverfahren abhängig.

MammaPrint wurde speziell für Tumore validiert, bei denen es sich um invasive duktales oder lobuläre Karzinome handelt. Die Testung anderer Probentypen (z. B. aus den Lymphknoten) wurde nicht evaluiert.

### ***Zu erwartende Werte***

---

Das MammaPrint-Ergebnis wird als binäres Ergebnis bereitgestellt und wird entweder als niedriges oder hohes Rezidivrisiko eingestuft. Das molekulare Profil einer Probe wird durch Berechnung des MammaPrint-Index (MPI) zwischen -1.000 und +1.000 bestimmt.

Wie für jeden anderen Test gilt auch für unseren Test ein vordefinierter Klassifizierungsschwellenwert. Der Schwellenwert für niedriges und hohes Risiko wurde auf 0 festgesetzt, um die höchstmögliche Sensibilität zu erzielen. Werte  $> 0,000$  werden als niedriges Risiko eingestuft, Werte  $\leq 0,000$  als hohes Risiko. Die durchschnittliche MPI-Genauigkeit insgesamt ist 98,5 %, wobei Scores  $< 0,1685$  bzw.  $> 0,168$  eine Genauigkeit von 100 % aufweisen.

#### ***„Borderline“-MPI-Werte***

Obgleich die technische Genauigkeit von MammaPrint extrem hoch ist, weisen Proben mit einem MPI-Wert nahe 0 eine etwas geringere Genauigkeit auf als Proben, die weiter vom Schwellenwert entfernt liegen. Besonders bei einem MPI im Bereich  $> -0,05$  bis  $< 0,05$ , der so genannten Borderline-Zone, sinkt die Testgenauigkeit unter 90 %. Bei einem MPI von 0,04 beispielsweise besteht eine 86 %-ige Sicherheit, dass das MammaPrint-Ergebnis im positiven Bereich ist (niedriges Risiko), und eine Möglichkeit von 14 %, dass es sich im negativen Bereich befindet (hohes Risiko). Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass Proben mit MPI-Werten außerhalb der Borderline-Zone eine durchschnittliche Genauigkeit von  $> 99$  % aufweisen.

### ***Leistungsmerkmale***

---

Die für MammaPrint untersuchten Leistungsmerkmale sind: Präzision und Reproduzierbarkeit, Messbereich und Klassifizierungsschwelle, analytische Spezifität und Nachweisgrenze.

#### ***Analytische Leistung***

Die Konkordanz der Ergebnisse von Frisch- und FFPE-Gewebe wurde in zwei Studien mit 91,5 % (n=221) bzw. 94,3 % (n=345) bewertet, wobei keine Verzerrung der MammaPrint-Ergebnisse zwischen beiden Gewebetypen festgestellt wurde. MammaPrint ist auch stabil zwischen verschiedenen Isolierungen, bei denen kein signifikanter Unterschied beobachtet wurde ( $p=0,994/p=0,290$ ), sowie zwischen verschiedenen Standorten und zwischen verschiedenen Scannern, und zeigt eine hohe Präzision (97,3 %), Reproduzierbarkeit (96 %) und Wiederholbarkeit (97,8 %)<sup>(4)</sup>.

Darüber hinaus wurde für das FG-Array kein Unterschied zwischen den Ergebnissen der wiederholten RNA-Isolierungen, der Präzision (98,47 %), der Reproduzierbarkeit (97,73 %) und der Wiederholbarkeit (98,74 %) festgestellt, und die Übereinstimmung zwischen den 8pack- und FG-Array-Ergebnissen zweier separater Datensätze betrug 98,52 % (n = 135) und 94,27 % (n = 698).

Der Messbereich des MammaPrint-Index ist auf Werte von -1,00 bis +1,00 festgesetzt, und die Klassifizierungsschwelle des MammaPrint-Index (MPI) auf +0,0. Ein MPI unter und gleich 0,0 wird als hohes Risiko eingestuft. Ein MPI über 0,0 wird als geringes Risiko betrachtet.<sup>(1, 2, 4)</sup>

Es wurde eine Interferenzstudie mit dem Vollgenom-Array (FG-Array) durchgeführt, um festzustellen, ob vier relevante Substanzen die MammaPrint-FFPE-Ergebnisse beeinträchtigen. Die Ergebnisse zeigten, dass DNA-Kontaminationen bis zum 2,5-fachen des Hintergrundniveaus und Proteinspitzen während der RNA-Isolierung sowie Ethanol- und AMPure-XP-Beads-Überträge während der cDNA-Aufreinigung die MammaPrint-Ergebnisse nicht beeinträchtigten. Insgesamt haben störende Gewebebestandteile keinen Einfluss auf den MammaPrint-Index, da die ursprüngliche Tumorserie repräsentativ für Brustkrebsproben war und auch hier die anderen Gewebebestandteile zufällig verteilt waren und nicht mit einem Krankheitsausgang in Verbindung standen.<sup>(1)</sup>

Um die Nachweisgrenze zu ermitteln, wurden die MammaPrint-FFPE-Ergebnisse über die verschiedenen Verdünnungen hinweg verglichen, wobei sich sehr stabile Ergebnisse selbst bei sehr geringen cDNA-Mengen auf dem Array ergaben. Auf der Grundlage der Ergebnisse liegt die Nachweisgrenze für den cDNA-Input bei 900 ng. Darüber hinaus wurde die Nachweisgrenze für den RNA-Input gemäß einer separaten Studie auf 8,24 ng festgesetzt.

#### Klinische Validierung

Die Ergebnisse beruhen auf den bereits zuvor veröffentlichten Daten für das molekulare Profil von 70 Genen<sup>(1)</sup> für Brustkrebs. Patientinnen mit gutem Ergebnis werden als Patientinnen mit niedrigem Risiko eingestuft (d. h. keine Fernmetastasen in mindestens 5 Jahren). Patientinnen mit schlechterem Ergebnis werden als Patientinnen mit hohem Risiko eingestuft (d. h. höhere Wahrscheinlichkeit von Fernmetastasen innerhalb von 5 Jahren). Der numerische Wert des MammaPrint-Index wird bereitgestellt.

MammaPrint wurde mithilfe von nicht adjuvant behandelten, lymphknotennegativen, hauptsächlich europäischen Patientinnen entwickelt, um die Biologie des Primärtumors in einem Genexpressionsprofil zu erfassen.<sup>(1,2)</sup> Im Januar 2013 wurden die 5-Jahres-Ergebnisse der prospektiven Beobachtungsstudie RASTER veröffentlicht.<sup>(4)</sup> Diese Auswirkungsstudie war die erste Biomarkerstudie ihrer Art, bei der das MammaPrint Fresh Assay Einsatz fand. An der Studie nahmen 427 Patientinnen mit Brustkrebs im Frühstadium im Alter von 18-61 Jahren, pT1 und pT2, lymphknotennegativ, ER +/-, HER2 +/- im Vorfeld der vom Arzt und Patientin zu treffenden Entscheidung bezüglich adjuvanter Therapie teil. Die Patientinnen wurden gemäß den Standardverfahrensrichtlinien behandelt, wobei alle relevanten klinisch-pathologischen Faktoren sowie die MammaPrint-Signaturergebnisse berücksichtigt wurden.

Anschließend wurde der MammaPrint-Test auch mit FFPE-Gewebe der RASTER-Patientinnen durchgeführt. Die MammaPrint-Ergebnisse wurden anhand von 345 gepaarten frischen und FFPE-RASTER-Proben mit den Ergebnisdaten nach fünf Jahren verglichen. Ohne Berücksichtigung anderer Kovariate außer dem MammaPrint-Testergebnis wiesen Patientinnen, die aufgrund des MammaPrint-FFPE als Patientinnen mit niedrigem Risiko eingestuft wurden (71 adjuvant behandelt und 108 nicht adjuvant behandelt), eine Rezidivwahrscheinlichkeit von 1,3 % (95 % CI 0–3,1) innerhalb von fünf Jahren auf.<sup>(6)</sup>

Patientinnen, die aufgrund des MammaPrint-FFPE als Patientinnen mit einem hohen Risiko eingestuft wurden (145 adjuvant behandelt und 21 nicht adjuvant behandelt) wiesen eine Rezidivwahrscheinlichkeit von 11,7 % (95 % CI 6,6–16,8) innerhalb von fünf Jahren auf.<sup>(6)</sup>

MammaPrint wurde bei über 75.000 Brustkrebspatientinnen unabhängig validiert. Die Ergebnisse wurden in führenden medizinischen und wissenschaftlichen Fachzeitschriften mit Peer-Review veröffentlicht. Dabei hat sich gezeigt, dass der Test von klinisch-pathologischen Risikobewertungen unabhängige Informationen liefert.<sup>(6,7)</sup>

### **Test bestellen**

---

Von Ihrer Kontaktperson bei Agendia erhalten Sie einen Probenentnahme-Kit. Tragen Sie die Tumorprobe mithilfe des Kits gemäß den Anweisungen auf die Objektträger auf oder fertigen Sie einen FFPE-Block an. Geben Sie Ihre Bestellung über unser Online-Portal auf oder füllen Sie das Testanforderungsformular aus, das Sie im Entnahme-Kit finden. Details finden Sie in der Gebrauchsanweisung dieses Kits.

Wenn Sie zusätzliche Unterstützung oder Informationen benötigen, wenden Sie sich bitte an [Customerservice@agendia.com](mailto:Customerservice@agendia.com) oder +31 (0)20 462 1510.

### **Quellenangaben**

---

1. van 't Veer et al. Nature 2002, 415(31): 530-536
2. van de Vijver et al. New Engl J Med 2002, 347(25): 1999-2009
3. Haan et. al. Genes Chromosomes Cancer 2021; (61):148-160
4. Sapino et al. J Mol Diagnostics 2014, 16: 190-197
5. Drukker et al. Int J Cancer 2013, 133(4): 929-936
6. Beumer et al. Breast Cancer Res Treat 2016, DOI 10.1007/s10549-016-3764-5
7. Piccart et al. Lancet Oncol. 2021. 22(4):476-488

### **Hinweis:**

Bitte melden Sie ernste Störfälle im Zusammenhang mit MammaPrint FFPE dem Hersteller und der zuständigen Instanz des Mitgliedstaats. Der Hersteller meldet die ernstesten Störfälle der zuständigen Instanz des Mitgliedstaats, in dem der Benutzer/Patient ansässig ist.

### **Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)**

Akkreditierungszertifikate: Agendia, Inc.:  
05D1089250

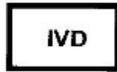
### **Fertigungsdaten**



Agendia NV  
Radarweg 60  
1043 NT Amsterdam, Niederlande  
Tel.: +31 (0)20 462 1510  
Mail: [customerservice@agendia.com](mailto:customerservice@agendia.com)

Agendia Diagnoselabor, Adresse  
Agendia, Inc.:  
22 Morgan,  
Irvine, CA 92618, USA E-  
Tel.: +1 888 321 2732  
Fax: +1 866 756 7548  
[www.agendia.com](http://www.agendia.com)

**Basis-UDI-DI: 0850024841MammaPrintK9**



© 2021 Agendia NV. Alle Rechte vorbehalten. Agendia, das Agendia-Logo und MammaPrint sind eingetragene Marken von Agendia NV.

MKT-517-V2

Ausgabedatum: Februar 2025

**Änderungen bezüglich Vorgängerversion**

Version 2 – Erweiterung des Verwendungszwecks, Aktualisierung der analytischen Leistung, Referenzteil, Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Erstveröffentlichung 3. November 2022